

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experimental* dengan menggunakan *the post test only control group design* dimana sampel dipilih secara random dan dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari 3 kelompok kontrol yaitu kontrol sehat, kontrol negatif, kontrol positif dan 2 kelompok perlakuan yaitu P1 dan P2

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Ekstraksi Tanaman

Penelitian Ekstraksi tanaman bertempat di Laboratorium Farmasi Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu ekstraksi dilakukan pada bulan september 2018.

4.2.2 Pengujian Aktivitas Secara In Vivo

Pengujian aktivitas berupa pemberian perlakuan maupun pengambilan sampel ginjal dengan pembedahan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang dan analisis kalsium pada ginjal dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Prosedur penelitian

4.3.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman nampu (*Homalomena occulta*) dilakukan di LIPI Purwodadi (Institut Riset di Jawa Timur) Sembung Kidul, Parerejo, Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur.

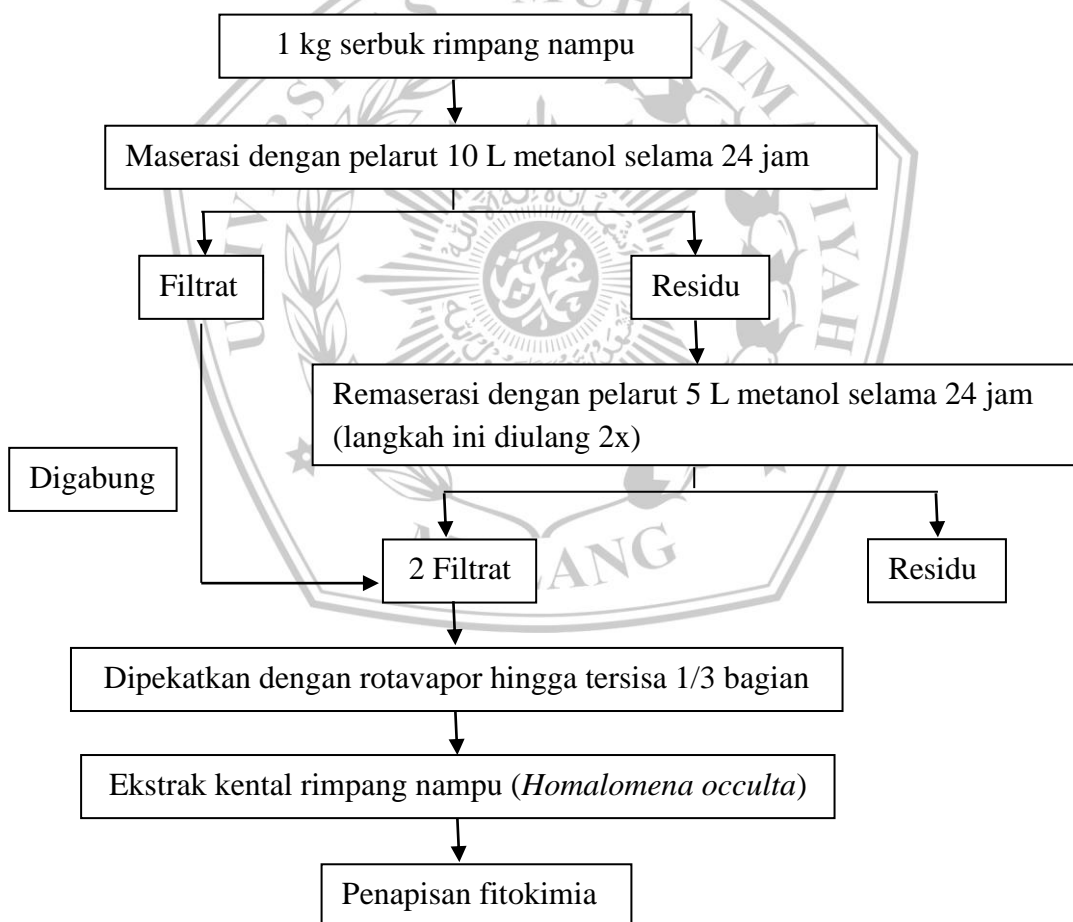
4.3.2 Prosedur Ekstraksi Rimpang Nampu

Pembuatan ekstrak rimpang nampu dilakukan dengan cara maserasi perendaman menggunakan metanol. Sebanyak 1 kg serbuk rimpang nampu dimasukkan ke dalam bejana lalu ditambahkan pelarut etanol sebanyak 10 L.

Pastikan seluruh simplisia terendam selama 24 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan hingga diperoleh residu dan filtrat (ekstrak cair). Residu dilarutkan kembali dalam etanol 5 L dan diaduk selama 30 menit lalu direndam kembali selama 24 jam setelahnya dan disaring dengan pelarut yang baru. Dalam proses ekstraksi dilakukan 2 kali pergantian pelarut setiap perendaman selama 24 jam dan hasil filtrat disatukan dan dipekatkan menggunakan *rotavapor rotary evaporator* (40°-60°C dan 75 rpm) sampai 1/3 bagian volume awal dan kemudian diuapkan dengan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental rimpang nampu. Kemudian dihitung rendemennya.

Rendemen=

$$\frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat bahan yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$



Gambar 4.1 Skema Pembuatan Ekstrak Rimpang Nampu

4.3.3 Prosedur Penapisan Fitokimia

4.3.3.1 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoida

(1) Persiapan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoida

Sampel ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan identifikasi senyawa golongan flavonoida dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

A. Preparasi Larutan Blanko

- 1) 0,1 gram ekstrak ditambahkan 3 mL n-heksana kemudian dikocok dan dilakukan berkali-kali dalam tabung reaksi hingga ekstrak tidak berwarna.
- 2) Residu yang didapat dilarutkan dalam 10 mL etanol. Larutan tersebut digunakan sebagai larutan blanko.

B. Preparasi Larutan Sampel

- 1) 0,3 gram ekstrak ditambahkan 3 mL n-heksana kemudian dikocok dan dilakukan berkali-kali dalam tabung reaksi hingga ekstrak tidak berwarna.
- 2) Residu yang didapat dilarutkan dalam 15 mL etanol. Larutan tersebut kemudian dibagi menjadi 3 bagian untuk digunakan pada uji bate-smith metcalf, uji wilstater dan kromatografu lapis tipis.

(2) Reaksi Warna

A. Uji Bate-Smith Metcalf

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan pengujian melalui uji bate-smith metcalf dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil 1 larutan yang telah dibagi ditambah 0,5 mL HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati perubahan warna yang terjadi.
- 2) Bila menjadi warna merah terang atau ungu maka pada ekstrak mengandung adanya senyawa leukoantosianin.

B. Uji Wilstater

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan pengujian melalui uji Wilstater dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil 1 larutan yang telah dibagi ditambah 0,5 mL HCl pekat dan 4 potongan magnesium.
- 2) Diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian ditambah 2 mL air suling, dan ditambah 1 mL butanol.
- 3) Diamati warna yang terjadi. Perubahan warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat adanya flavonol, merah tua adanya flavonon.

(3) Kromatografi Lapis Tipis

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan uji kromatografi lapis tipis dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil 1 larutan yang telah dibagi kemudian ditotolkan pada fase diam.
- 2) Uji kromatografi lapis tipis menggunakan:
 - Fase diam : Kiesel gel 254
 - Fase gerak : Kloroform:aseton:asam formiat (6:6:1)
 - Penampak noda : - pereaksi sitrat borat atau uap ammonia atau asam sulfat 10%
- 3) Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.

4.3.3.2 Identifikasi Senyawa Golongan Glikosida Saponin, Triterpenoid dan Steroid

1. Uji Buih

Sampel yang digunakan dalam uji buih adalah ekstrak etanol rimpang nampu dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

A. Preparasi Larutan Blanko

Ditimbang ekstrak 0,2 gram dimasukkan tabung reaksi, larutan tersebut digunakan sebagai larutan blanko

B. Uji Buih

Ditimbang ekstrak 0,2 gram dimasukkan tabung reaksi, kemudian ditambah air suling 10 mL, kocok kuat-kuat kira-kira selama 30 detik. Tes buih

positif apabila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan.

2. Reaksi Warna

A. Preparasi Sampel

1) Preparasi Larutan Blanko

0,2 gram ekstrak dilarutkan dalam 5 mL etanol. Larutan tersebut digunakan sebagai larutan blanko.

2) Preparasi Larutan Sampel

0,4 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol. kemudian dibagi menjadi dua bagian masing-masing bagian 5 mL untuk digunakan pada uji lieberman-burchard dan uji salkowski.

B. Uji Lieberman-Burchard

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi kemudian dilakukan uji Liberman-burchard dengan langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil satu larutan yang telah dibagi ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat, diamati adanya perubahan warna.
- 2) Warna hijau biru adanya saponin steroid, merah ungu adanya saponin triterpenoid, warna kuning muda adanya saponin triterpenoid/saponin steroid jenuh.

C. Uji Salkowski

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan uji salkowski dengan langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil satu larutan yang telah dibagi ditambah 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi.
- 2) Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbul cincin berwarna merah.

3. Kromatografi Lapis Tipis

A. Identifikasi Sapogenin Steroid/Triterpenoid

Sampel ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan uji kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi adanya kandungan sapogenin steroid atau triterpenoid dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987):

1) 0,5 gram ekstrak ditambah 5 mL asam klorida 2N, dididihkan dan ditutup dengan corong berisi kapas basah selama 50 menit untuk menghidrolisis saponin.

2) Setelah dingin, tambah ammonia hingga basa, kemudian ekstraksi dengan 4-5 mL n-heksana sebanyak 2x, uapkan ad 0,5 mL, totolkan pada plat KLT.

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1)

Penampak noda : anisaldehid asam sulfat (dengan pemanasan)

Adanya sapogenin ditunjukkan dengan warna merah ungu (ungu) untuk anisaldehyd asam sulfat.

B. Identifikasi Terpenoid Atau Steroid Bebas Secara KLT

Sampel ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan uji kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi adanya kandungan terpenoid/steroid dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

1) Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes n-heksan, aduk hingga larut, totolkan pada fase diam.

2) Uji kromatografi lapis tipis menggunakan:

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1)

Penampak noda : anisaldehyd asam sulfat (dengan pemanasan)

3) Adanya terpenoid atau steroid ditunjukkan dengan warna merah ungu atau ungu.

4.3.4 Prosedur Uji Aktivitas

4.3.4.1 Persiapan Hewan Uji

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang berusia 8-12 minggu dengan bobot $200 \text{ g} \pm 20\%$. Sampel dipilih secara randomisasi dari populasi tikus yang ada. Tikus diadaptasi selama 7 hari untuk menyesuaikan kondisi tempat sebelum dilakukannya percobaan. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup yang terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam dimana masing-masing kandang berisi 4 ekor tikus yang dipisahkan

oleh sekat, yang memungkinkan masih terdapat interaksi antara tikus satu dengan lainnya sehingga meminimalkan resiko terjadinya *stress*. Suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ dengan kelembapan relatif 30-70% dan terdapat pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. (BPOMRI, 2014)

Setelah masa adaptasi selesai atau pada hari ke-8 hewan coba dikelompokkan berdasarkan kelompok percobaan dan diberikan tanda dibagian ekor untuk membedakan antara tikus satu dengan tikus lainnya. Dimana kelompok K (+), K (-), P1, P2 dan P3 diinduksi dengan etilenglikol dan amonium klorida secara oral. Sedangkan kelompok sehat (KS) hanya diberi pakan standart BR 1.

4.3.4.2 Persiapan Laurant Penginduksi

A. Etilen Glikol

Dosis etilen glikol yang akan diinduksikan pada tikus untuk membentuk batu ginjal adalah 1% (Moram, 2016).

B. Amonium Klorida

Dosis amonium klorida yang akan diinduksikan pada tikus sebagai katalisator untuk pembentukan batu ginjal adalah 1% (Moram, 2016).

4.3.4.3 Persiapan Kontrol Positif

Dosis cystone yang akan diinduksikan pada tikus sebagai kontrol positif adalah 750 mg/kg BB. (Ahmed *et al.*, 2013)

4.3.4.4 Persiapan Larutan Uji

Sediaan ekstrak etanol rimpang nampu yang akan digunakan sebagai sediaan uji dibagi menjadi 3 dosis yaitu 250 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB. Ekstrak etanol rimpang nampu dipreparasi menjadi sediaan suspensi dengan *suspending agent* CMC Na.

4.3.4.5 Prosedur Uji Aktivitas Pada Tikus

Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok, diberikan perlakuan selama 17 hari. Kelompok I adalah kontrol normal, tikus diberi makan dan minum

secukupnya. Kelompok II adalah kelompok kontrol negatif, tikus diberi induksi etilen glikol 1% dan amonium klorida 1% secara oral. Kelompok III adalah kelompok kontrol positif atau pembanding, tikus diberi Cystone[®] dosis 750 mg/kgBB dimana 2 jam sebelumnya diberi etilen glikol 1% dan amonium klorida 1% secara oral. Kelompok IV adalah kelompok uji, tikus diberi ekstrak etanol rimpang nampu dosis 250 mg/kg BB dimana 2 jam sebelumnya diberikan etilen glikol 1% dan amonium klorida 1% secara oral. Kelompok V adalah kelompok uji, tikus diberi ekstrak etanol rimpang nampu dosis 500 mg/kg BB dimana 2 jam sebelumnya diberikan etilen glikol 1% dan amonium klorida 1% dengan rute oral. Kelompok VI adalah kelompok uji, tikus diberi ekstrak etanol rimpang nampu dosis 1000 mg/kg BB dimana 2 jam sebelumnya diberikan etilen glikol 1% dan amonium klorida 1% dengan rute oral.

4.3.4.6 Analisis Sampel

A. Analisis Karakteristik Ginjal

Masing-masing ginjal ditimbang, dicatat karakteristik bentuk dan warna ginjal. Selanjutnya dihitung rasio bobot ginjal/bobot tikus.

Untuk menghitung rasio menggunakan rumus (Saha and Verma, 2011) :

$$\text{Rasio Ginjal (g/100g)} = \frac{\text{Berat ginjal tikus (g)}}{\text{Berat badan tikus (100 g)}}$$

B. Analisis Kadar Kalsium pada Ginjal

Ginjal tikus disimpan ke dalam cawan penguap dan dimasukkan ke dalam oven 100°C selama 24 jam. Setelah itu ginjal kering digerus dalam mortir kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 ml asam nitrat pekat kemudian panaskan di atas penangas, pemanasan dihentikan sebentar, kemudian ditetaskan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) lalu lanjutkan pemanasan. Penambahan tetes Hidrogen Peroksida dilakukan berulang kali sampai larutan jernih.

Hasil dekstruksi didinginkan, kemudian diambil 5 ml dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 50 ml lalu disaring dengan kertas whatman. Kemudian larutan diukur dengan menggunakan SSA (Afrianti dan Harun, 2011).

Menurut Gandjar dan Rohman (2007), kalsium dalam ginjal tikus dihitung dengan rumus :

$$\text{kadar kalsium } (\mu\text{g/ml}) = \frac{X \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \cdot V(\text{ml})}{V_s(\text{ml})} \times F_p$$

X = Konsentrasi analit dalam larutan sampel

V = Volume total larutan sampel yang diperiksa

F_p = Faktor pengenceran dari hasil dekstruksi

V_s = Volume sampel

4.3.4.7 Uji Statistik Kadar Kalsium pada Ginjal

Hasil percobaan dianalisis secara statistik, dimana data hasil kadar kalsium ginjal seluruh hewan coba uji penghambatan batu ginjal dilakukan uji dengan *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan yang bermakna antar kelompok.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Alat Untuk Ekstraksi

Alat yang digunakan dalam ekstraksi dengan metode maserasi adalah :

- (1) Seperangkat alat ekstraksi (gelas piala, gelas ukur, bejana maserasi, labu penyaring, *vacuum filtration*, labu alas bulat, pipet tetes, batang pengaduk, *aluminium foil*, karet, tisu, *mixer*, kertas saring, corong *buchner*, cawan porselen, sudip, pinset, dan penangas air).
- (2) *Rotary evaporator* (Heidolph).
- (3) Timbangan digital (OHAUS SP 202 Scout Pro 200x0,1g).
- (4) Timbangan *analytic balance* (Sartorius ED224).

Alat Untuk Penapisan Fitokimia

Alat yang digunakan dalam penapisan fitokimia adalah sebagai berikut :

- (1) Seperangkat alat untuk preparasi sampel (tabung reaksi, gelas ukur, penangas air, pipet tetes, corong gelas, kapas, pinset, penjepit kayu, sudip, dan tisu).
- (2) Timbangan digital (OHAUS SP 202 Scout Pro 200x0,1g).
- (3) Timbangan *analytic balance* (Sartorius ED224).
- (4) *Hot plate* (Fisher Scientific).

- (5) Pipa kapiler (Blaubrand®).
- (6) Plat Kromatografi Lapis Tipis (E. Merck).
- (7) Bejana Kromatografi Lapis Tipis (CAMAG).
- (8) Lampu UV 254 dan 365 (Vilber Lourmat).

Alat Untuk Uji Aktivitas

- (1) Seperangkat alat untuk uji aktivitas adalah sebagai berikut : Pipet tetes, Batang pengaduk, Beaker glass, Pinset, Alat bedah tikus, Kandang tikus, Sonde, Spuit 5 cc, Kapas

4.4.2 Bahan

Bahan Untuk Ekstraksi

Bahan yang digunakan dalam ekstraksi dengan metode maserasi adalah sebagai berikut :

- (1) Serbuk simplisia rimpang nampu (*Homalomena occulta*).
- (2) Etanol 96% teknis (Brataco).

Bahan Untuk Penapisan Fitokimia

Bahan yang digunakan dalam penapisan fitokimia adalah sebagai berikut:

- (1) Ekstrak etanol rimpang nampu (*Homalomena occulta*).
- (2) Asam klorida (HCl) p.a (Mallinckrodt Chemicals).
- (3) Natrium klorida (NaCl) (SAP Chemicals).
- (4) Toluena p.a (E. Merck).
- (5) Hidrogen peroksida (H₂O₂) p.a (E. Merck).
- (6) Besi (III) klorida (FeCl₃).
- (7) Kalium hidroksida (KOH) (SAP Chemicals).
- (8) Potongan magnesium p.a (E. Merck).
- (9) Butanol p.a (E. Merck).
- (10) Kloroform (CHCl₃) p.a (Fulltime Chemicals).
- (11) Aseton p.a (Mallinckrodt Chemicals).
- (12) Asam formiat p.a (E. Merck).
- (13) Asam asetat anhidrat p.a (E. Merck).
- (14) Asam sulfat (H₂SO₄) p.a (Mallinckrodt Chemicals).
- (15) Ammonia (Brataco).

- (16) Etil asetat p.a (E. Merck).
- (17) Anisaldehyda asam sulfat.
- (18) n-Heksana p.a (E. Merck).
- (19) Etanol 96% teknis (Brataco).
- (20) Air suling (Brataco).

Bahan Untuk Uji Aktivitas

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas adalah sebagai berikut :

- 1) Serbuk rimpang Nampu (*Homalomena occulta*)
- 2) Etanol 96% Teknis (Brataco)
- 3) Air Suling (Brataco)
- 4) Hewan Coba
- 5) Cystone®
- 6) Etilen glikol ($C_2H_6O_2$) Teknis
- 7) Amonium Klorida p.a (Riedel-deHaen)
- 8) Pakan tikus

